

Patent Assignee: (CETU) CL S CORP

Author (inventor): BJORN M J; FRANKEL A E; LAIRD W J; RING D B; WINKELHAKE
J L

Number of Patents: 002

Patent Family:

CC Number	Kind	Date	Week
EP 226418	A	870624	8725 (Basic)
JP 62209098	A	870914	8742

B21

Priority Data (CC,No,Date): US 806256 (851206);

Applications (CC,No,Date): EP 86309515 (861205); JP 86289791 (861205);

EP and/or WO Language: English

EP and/or WO Cited Patents:

No .SR.Pub; A3 ...8817; EP 121388; EP 74279; WO 8300810; 5.Jnl.REF;

Designated States (Regional): AT; BE; CH; DE; FR; GB; IT; LI; NL; SE

Abstract (Basic): EP0226418

An immunotoxin (I) comprising a cytotoxic moiety and an antigen-binding portion selected from the Fab, Fab' or F(ab')₂ region of a monoclonal antibody is new when the monoclonal antibody (a) binds human ovarian cancer tissue; (b) has a selectivity of 0.11 or less; and (c) is an IgG or IgM.

(I) has a cytotoxicity ID50 of up to 10 nM against human ovarian cancer cells; it retards the growth of tumours comprising human ovarian cancer cells, carried by a mammal; or it extends the survival time of such a mammal.

USE/ADVANTAGE - (I) is useful for the treatment of human ovarian cancers, as it retards the growth of and kills the cancer cells. (I) may be used to kill the cancer cells in vitro in the diagnosis of the cancer. Dose is 0.01-100 mg/kg intraperitoneally. @ (21pp Dwg.No.0/0)@

File Segment: CPI

Derwent Class: B04; D16;

Int Pat Class: A61K-035/74; A61K-037/02; A61K-047/00; A61K-039/00;

C07K-015/12; C12N-015/00;

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B02C5; B04-B04A3; B04-B04A4; B12-G07; B12-K04A1
; D05-H09;

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M423 M710 M903 P631 P633 P831 Q233 V600 V611

BEST AVAILABLE COPY

⑬ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和62年(1987)9月14日

C 07 K 15/12
A 61 K 39/00
C 12 N 15/00

ADU

8318-4H
7252-4C
7115-4B

※審査請求 未請求 発明の数 4 (全19頁)

⑮ 発明の名称 抗-ヒト卵巣癌免疫毒素及びその使用方法

⑯ 特 願 昭61-289791

⑰ 出 願 昭61(1986)12月6日

優先権主張 ⑱ 1985年12月6日 ⑲ 米国(US) ⑳ 806256

⑳ 発 明 者 マイケル ジョン ブ ヨルン アメリカ合衆国, カリフォルニア 94547, ハーキュリーズ, オリーブ コート 109
㉑ 発 明 者 デイビッド バラット アメリカ合衆国, カリフォルニア 94061, レッドウッド シティ, トルーマンストリート 1248
㉒ 発 明 者 アーサー エドワード フランケル アメリカ合衆国, ノースカロライナ 27514, チャペル, ハンテイントンドライブ 223
㉓ 出 願 人 シタス コーポレイション アメリカ合衆国, カリフォルニア 94608, エミリービル, ファイフティサードストリート 1400
㉔ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外4名

最終頁に続く

明細書の浄書(内容に変更なし)

明 細 書

1. 発明の名称

抗-ヒト卵巣癌免疫毒素及びその使用方法

2. 特許請求の範囲

1. 細胞毒性成分及びモノクローナル抗体の Fab, Fab' 及び F(ab')₂ から成る群から選択された抗原結合部分を含む免疫毒素であって、前記モノクローナル抗体が

(i) ヒト卵巣癌組織を結合し;

(ii) 0.11又はそれよりも低い選択性を有し;

そして

(iii) IgG 又は IgM であり;そして

ヒト卵巣癌細胞に対して 10 nM 又はそれよりも低い細胞毒性 ID₅₀; ヒト卵巣癌細胞を担持する哺乳類を前記免疫毒素により処理する場合、前記哺乳類によって担持されるそのような細胞から成る腫瘍の増殖速度をおそくすること;又は前記哺乳類を前記免疫毒素により処理する場合、ヒト卵巣癌細胞から成る腫瘍を担持する哺乳類の生存時間を延ばすことから成る群から選択された少なく

とも1つの能力を有する免疫毒素。

2. 前記ヒト卵巣癌細胞が OVCAR-2, OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-5 及び A1847 から成る群から選択された少なくとも1つのものである特許請求の範囲第1項記載の免疫毒素。

3. 前記モノクローナル抗体を、2G3, 9C6, 33F8, 44B2, 44P4, 120H7, 200F9, 204P4, 219F3, 245E7, 260F9, 266B2, 280D11, 317G5, 369F10, 388D4, 421E8, 454C11, 454A12, 451C3, 650E2, 788G6, 871E3 及び多くの前記群に機能的に等しいモノクローナル抗体から成る群から選択する特許請求の範囲第1項記載の免疫毒素。

4. 前記モノクローナル抗体が、高分子量ムチン、260F9 又は 266B2 によって結合され得る 55 kD 抗原の1つのエピトープ、200kD 抗原及び 42 kD タンパク質性抗原から成る群から選択された抗原を結合せしめる特許請求の範囲第1項記載の免疫毒素。

5. 前記成分が、リシン毒素 A 項、フィトラカアメリカナ (Phytolacca americana) タンパク質、

ジフテリア毒素Aフラグメント、ジフテリア毒素Aフラグメントの非結活性フラグメント及びブソイドモナスアエルギノサ(*Pseudomonas aeruginosa*)外毒素Aから成る群から選択された、細菌、植物又はカビ起源の酵素的に活性の毒素である特許請求の範囲第1項記載の免疫毒素。

6. 前記リシン毒素A鎖が組換え体リシン毒素A鎖である特許請求の範囲第1項記載の免疫毒素。

7. ヒトトランスフェリン受容体に結合するが、しかしそこへトランスフェリンの結合を阻止しないモノクローナル抗体の抗原結合部分を少なくとも含む特許請求の範囲第1又は2項記載の免疫毒素。

8. 前記モノクローナル抗体の抗原結合部分がそのF(ab')₂部分を含む特許請求の範囲第7項記載の免疫毒素。

9. ヒト卵巣腫瘍細胞から成る腫瘍を担持する哺乳類の生存時間を延ばす方法であって、前記哺乳類の生存時間を延ばすのに有効な、特許請求の範囲第1、2又は7項記載の免疫毒素の量を前記

哺乳類に投与することから成る方法。

10. 哺乳類によって担持されるヒト卵巣癌細胞から成る腫瘍の増殖速度をおそくする方法であって、前記哺乳類によって担持されるヒト卵巣腫瘍の増殖速度をおそくするのに有効な、特許請求の範囲第1、2又は7項記載の免疫毒素の量を前記哺乳類に投与することから成る方法。

11. ヒト卵巣癌細胞を殺す方法であって、特許請求の範囲第1、2又は7項記載の、細胞毒性的に有効な量の免疫毒素と前記細胞とを接触することから成る方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、免疫学及び癌診断法並びに治療法の分野に関する。さらに詳しくは、それは、ヒト卵巣癌に対して活性のネズミモノクローナル抗体、これらの抗体を産生するハイブリドマ、これらの抗体から製造される免疫化学物質及びこれらの免疫化学物質を使用する治療方法に関する。

以下余白

(従来の技術)

アメリカ人女性に存在する婦人科学的な悪性腫瘍の中では、卵巣癌が最っとも頻りに死を引き起こす。その悪性腫瘍は、実質的にその全体の臨床経過の間、腹腔腔内に存続する。特徴として、その腫瘍は、複数の腹膜表面上に腹水病巣又は腫瘍病巣を生みながら、腹腔腔じゅうに広がる。その疾患は、手術によって効果的に治癒され得ず、その結果、ますます化学療法が主要な治療となり得る。卵巣の腫瘍は、一般的に、腹腔腔内に存続するので、化学療法薬が、静脈注射又は腹腔腔中への直接的注入によって全身に投与され、従って化学療法薬への腫瘍の初めの接触のためのルートとして循環系を避けることができる。

癌性卵巣組織に関連する抗原に対するモノクローナル抗体の使用が、限定された範囲のみで報告されて来た。ブソイドモナスの外毒素に結合されるヒトトランスフェリン受容体に対する抗体は、あるヒト卵巣癌細胞系において細胞毒性活性を有することが報告されている(Pirkorなど、*ブソイ

ドモナスの外毒素に結合される抗-トランスフェリン受容体抗体;ヒト卵巣癌細胞系における典型的な免疫毒素*,*Cancer Res.* 45:751~757(1985))。トランスフェリン受容体へのトランスフェリンの結合を阻害する抗-トランスフェリンモノクローナル抗体は、アメリカ特許第4,434,156号の主題である。本発明の抗-トランスフェリンモノクローナル抗体は、アメリカ特許第4,434,156号に開示されている抗体とは異なる。本発明の抗-トランスフェリン抗体は、トランスフェリン受容体に結合するが、それは、トランスフェリン受容体へのトランスフェリンの結合を阻害しない。Schlomなど、アメリカ特許第4,522,918号は、ヒト乳癌の可溶性抽出物を用いて、あるヒト乳癌腫瘍に対するモノクローナル抗体の産生方法を開示する。

(問題点を解決するための手段)

本発明の主な観点は、

(a) ヒト卵巣癌組織の冷凍断片を結合し;

098(2)

卵巣癌細胞
方法であっ
ト卵巣腫瘍
を許請求の
り量を前記

って、特許
細胞毒性的
を触するこ

治療法の
、ヒト卵
ル抗体、
これらの
これらの免

ンスフェ
ける典型
57(1985))
エリンの
ノクロ
号の主題
モノクロ
6号に関
ルトラ
を容体を
を容体へ
Schlom
ト乳癌
腫瘍に対
する。

(b) IgG 又は IgM であり；

(c) 細胞毒性成分に結合される場合、

OVC AR-2, OVC AR-3, OVC AR-4, OVC AR-5 又は
A1847 から成る群から選択された、少なくとも 1
つの卵巣癌細胞系に対して 10 nM 又はそれよりも
低い ID₅₀ を有し；又は

細胞毒性成分に結合される場合、

ヒト卵巣腫瘍を担持する哺乳類の生存時間を延ば
し；又は細胞毒性タンパク質に結合される場合、
そのような哺乳類によって担持されるヒト卵巣腫
瘍の増殖の速度をおおめるネズミのモノクローナ
ル抗体に関する。

これらの抗体の好ましい態様は、2G3, 9C6, 33F8,
44B2, 44F4, 120H7, 200F9, 204F4, 219F3, 245E7, 260F9,
266B2, 280D11, 317G5, 369F10, 388D4, 421E8, 451C3,
454A12, 454C11, 650E2, 788G6, 871E3 と呼ばれる抗
体及びそれらと機能的に等しい抗体である。

上記抗体を産生する、ネズミ×ネズミのハイブ
リドーマ及びこれらのハイブリドーマの子孫は、
本発明の他の観点である。

物を意味する。抗体の源又はそれが製造される方
法に関して、制限されることは意図されていない。

本明細書に使用される場合、用語“モノクロー
ナル抗体の抗原結合部分”は、モノクローナル抗
体の特異的である抗原を結合するモノクローナル
抗体の部分の意味する。一般的に、モノクローナ
ル抗体の抗原結合部分は、Fab, Fab' 及び
F(ab')₂ 領域又は免疫グロブリン分子のフラグメ
ントを含む。免疫グロブリンの Fab, Fab' 及び
F(ab')₂ 領域は、当業者によく知られている技法
を用いて、モノクローナル抗体の酵素による消化
によって生成され得る。Fab フラグメントは、パ
パインによるそのモノクローナル抗体の消化及び
ジスルフィド結合を還元的に分離するために還元
剤と前記消化物とを接触することによって生成さ
れ得る。Fab' フラグメントは、ペプシンによる
モノクローナル抗体の消化及びそのようにして生
成されたフラグメントの還元剤による還元的分離
によって得られる。還元的分離の不在においては、
ペプシンによるモノクローナル抗体の酵素的消化

本発明のもう 1 つの観点は、

(a) 上記モノクローナル抗体、及び

(b) 細胞毒性成分の接合体である

免疫毒素に関する。

本発明のもう 1 つの観点は、ヒト卵巣腫瘍細胞
を担持する哺乳類の生存時間を延ばすために有効
な量の上記免疫毒素をそのような哺乳類に投与す
ることによって、そのような哺乳類の生存時間を
延ばす方法に関する。

さらに本発明のもう 1 つの観点は、細胞を殺す
のに有効な量の上記免疫毒素とヒト卵巣腫瘍細胞
とを接触することによってそのような細胞を殺す
方法に関する。

さらに本発明の観点は、上記免疫毒素の腫瘍細
胞増殖遅延量をそのような哺乳類に投与すること
によって、そのような哺乳類によって担持される
ヒト卵巣腫瘍細胞の増殖速度をおおめる方法に関
する。

本明細書に使用される場合、用語“モノクロー
ナル抗体”は、均質な抗体集団を有する抗体組成

が F(ab')₂ フラグメントを生成する。

本発明のモノクローナル抗体産生ハイブリド
ーマに関して本明細書に使用される場合、用語“子
孫(progeny)”は、世代又は株型の同一性にもかか
わらず、親によって産生されるモノクローナル抗
体-ヒト卵巣癌抗体を産生する親ハイブリドーマの
すべての誘導体、子及び子孫を含むように思われ
る。

ヒト卵巣癌に対する例示されたネズミのモノク
ローナル抗体に関して、本明細書に使用される場
合、用語“機能的同等物”とは、(a) 免疫沈殿法又は
サンドウィッチアッセイによって決定されるよう
に、例示されたモノクローナル抗体と同じ抗原又
はエピトープに結合し；(b) ヒト卵巣癌組織の
冷凍断片を結合し；(c) 0.11 又はそれよりも低
い選択性を有し；(d) G 又は M イソタイプを有
し；そして (e) 細胞毒性成分に接合される場合、
(i) ヒト卵巣癌細胞を担持する哺乳類に投与さ
れる場合、そのような哺乳類の生存時間を延ばし、
又は (ii) そのような細胞を担持する哺乳類に投

与される場合、そのような哺乳類中にヒト卵巣癌細胞の増殖をおさえ又は(Ⅲ)そのような細胞が免疫毒素と接触される場合、ヒト卵巣癌細胞に対して細胞毒性である免疫毒素を形成するモノクローナル抗体を意味する。

本明細書に使用される場合、上記のような用語「機能的同等物」とは、5種の基準を含む。例示されたモノクローナル抗体と同じ抗原又はエピトープに結合する、第1番目のこれらの基準は、機能的に等しいモノクローナル抗体によって、例示されたモノクローナル抗体のクロスブロックを示す実験によって実証され得る。クロスブロックは、例示された抗体の1つによって結合されるのと同じ抗原上のエピトープに結合する抗体の結果として、又は1つのエピトープへの抗体の結合が2番目のエピトープへの抗体の結合を妨げる、同じ抗原上にひじょうに接近して位置する異なったエピトープに結合する抗体の結果として生じる。

いわゆる「サンドイッチ」アッセイとは、抗体が同じ抗原又はエピトープを結合するかいづれか

を決定するためのもう1つの方法である。これらのアッセイにおいては、第1モノクローナル抗体が支持体、たとえば力価プレートウェルの表面に結合される。非特異的な結合を妨げるための処置の後、ひじょうに可溶化された抗原調製物を、その結合抗体に添加する。次に、検出可能なラベルを有する第2抗体、たとえば蛍光色素を添加する。第2抗体がその抗原に結合する場合、異なったエピトープ特異性又は同じ抗原上に複数コピーの同じエピトープが示される。第2抗体が結合しない場合、同じエピトープ特異性又は異なった抗原特異性のいずれかが示される。クロスブロッキング及びサンドイッチアッセイの両者の結果は、両抗体によって結合される抗原が同じ分子量を有することを示すために、第2シリーズの試験、たとえば免疫沈殿法又はウェスタン法によってさらに定義される。

本発明の免疫毒素は、モノクローナル抗体の接合体及び細胞毒性成分である。免疫毒素の細胞毒性成分は、細胞毒性薬物又は細菌；カビ又は植物

起源の酵素的に活性の毒素もしくは酵素的に活性のポリペプチド鎖又はそのような毒素のフラグメント("A鎖")である。酵素的に活性の毒素及びそのフラグメントが好ましく、そしてジフテリア毒素Aフラグメント、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、外毒素A(ブソイドモナスアエルギノサ(*Pseudomonas aeruginosa*)からの)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、 α -アルシン、あるアレウリトス フォリジ(*Aleurites fordii*)タンパク質、あるジアンチン タンパク質、フィトラカ アメリカーナ(*Phytolacca americana*)タンパク質(PAP, PAP II 及び PAP-S)、モモルジカ カランチア(*Momordica charantia*)阻害剤、クラシン、クロチン、サボナリア オフィシナリス(*Saponaria officinalis*)阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン及びエノマイシンによって例示される。リシンA鎖、ブソイドモナスアエルギノサの外毒素A及びPAPが好ましい。

モノクローナル抗体及びそのような細胞毒性成

分の接合体は、種々の二官能価タンパク質カップリング剤の使用により製造され得る。そのような試薬の例は、N-スクシンイミディル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)、イミノチオレーン(IT)、イミドエステルの二官能価誘導体、たとえばジメチル アジビミデート・HCl、活性エステル、たとえばジスクシンイミジル スベレート、アルデヒド、たとえばグルタルデヒド、ビス-アジド化合物、たとえばビス(P-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン、ジイソシアネート、たとえばトリレン2,6-ジイソシアネート及びビス-活性弗素化合物、たとえば1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンである。

本発明の免疫毒素の酵素的活性のポリペプチドは、組換により生成され得る。組換的に產生されたリシン毒素A鎖(rRTA)は、1985年8月15日に公表されたPCT W085/03508に開示された方法に従って產生され得る。組換的に產生されたジフテリア毒素A鎖及びその非結合性活性フラグメントも

また、1985年8月15日に公表されたPCT W085/03508 に記載されている。

診断目的のためにイン ビトロでヒト卵巣癌細胞を殺すために用いられる場合、その接合体は、典型的に、少なくとも約10nMの濃度で細胞培養培地に添加されるであろう。イン ビトロ使用のための投与の処方及び態様は、臨界的でない。培養物又は灌流培地と相容する水性配合物が通常、使用されるであろう。細胞毒性は、従来技術、たとえば色素排除又はクローン遺伝アッセイにおけるコロニー形成の抑制によって読取られ、対象の免疫毒素による処置に対して影響されやすい卵巣癌腫瘍の存在を決定することができる。

治療のためにイン ビトロに使用される場合、その免疫毒素は、治療上有効量（すなわち、患者の腫瘍の痛みを除去又は減じもしくは妨害する量）で患者に投与される。それらは通常、非経口的に、好ましくは腹腔内（IP）に投与されるであろう。その投与量及び投与法は、癌（原発性又は転移性）及びその集団の性質、特定の免疫毒素の特徴、た

例えばその治療指数、患者及び患者の病歴に依存するであろう。投与される免疫毒素の量（IP）は、典型的には、患者の体重当り約0.01～約100 μ g及び好ましくは0.01 μ g～10 μ gの範囲であろう。

非経口投与のためには、免疫毒素は、医薬的に許容可能な非経口ビークルと共に注入可能なユニット剤形（溶液、懸濁液、エマルジョン）で製剤されるであろう。そのようなビークルは、本質的に非毒性且つ非治療性である。そのようなビークルの例は、水、生理的食塩水、リンガー溶液、デキストロース溶液及び5%ヒト血清アルブミンである。非水性ビークル、たとえば固定油及びエチルオレエートがまた使用され得る。リボソームが担体として使用され得る。ビークルは、少量の添加物、たとえば等張性及び化学的安定性を増強する物質、たとえば緩衝液及び防腐剤を含むことができる。その免疫毒素は、典型的には、約0.01 μ g/ml～100 μ g/mlの濃度でそのようなビークル中に配合されるであろう。

卵巣癌を治療するための細胞毒性放射性薬品は、

抗体にアイソトープ（たとえばY, Pr）を放射する高い線エネルギー付与（LET）を活用することによって製造され得る。本明細書に使用される用語“細胞毒性成分”は、そのようなアイソトープを含むであろう。

本発明のハイブリドーマを製造するために使用される抗体産生融合パートナーは、生きているヒト乳癌細胞又はそれらから製造された膜抽出物によりマウスを免疫化することによって生成される。そのマウスは、免疫原性量の細胞又は抽出物により腹腔内に接種され、そして次に、同じ量の免疫原により追加免疫される。最終追加免疫の後、数日後、免疫化されたマウスから脾臓を集め、そして融合に使用するために細胞懸濁液をそれらから調製する。Buck, D.W., など、*In Vitro* (1982) 18: 377～381 によって変形されたようなKohler, B. and Milstein, C., *Nature* (1975) 256: 495～497 の一般的な体細胞ハイブリダイゼーション技法を用いて、脾臓細胞及びネズミ腫瘍パートナーから、ハイブリドーマを調製する。Salk Institute,

Cell Distribution Center, San Diego, California, USA から入手できるネズミ骨髄腫系を、このハイブリダイゼーションに使用することができる。基本的に、この技法は、フソゲン、たとえばポリエチレングリコールを用いて、その腫瘍細胞及び脾臓細胞を融合することを含む。融合の後、細胞は、融合培地から分離され、そして選択増殖培地、たとえばHAT培地中で増殖され、ハイブリッド形成しなかった親細胞を除去する。所望により、そのハイブリドーマを、拡張し、そして上清液を、抗原として免疫化剤（乳癌細胞又は膜抽出物）を用いて、従来のイムノアッセイ法（たとえば、ラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ又は蛍光イムノアッセイ）によって、抗-ヒト乳癌活性について分析する。陽性クローンが本発明の抗体の基礎に適合するかいつれかを決定するために、さらにそれを特徴づける。

そのような抗体を産生するハイブリドーマは、既知方法を使用して、イン ビトロ又はイン ビボで増殖され得る。好ましくは、そのハイブリド

ーマは、マウス中の腹水として維持される。そのモノクローナル抗体は、培養培地又は体液から、場合によっては、従来の免疫グロブリン精製法、たとえば硫酸アンモニウム沈殿法、ゲル電気泳動法、透析法、クロマトグラフィ法及び所望により限外濾過法によって単離され得る。

モノクローナル抗体の重要な特徴は、(1) それらの免疫グロブリンクラス、(2) ヒト卵巣癌組織を結合するそれらの能力、(3) さらに下記に定義されるようなそれらの選択性、すなわち(4) ヒト卵巣癌細胞に対して細胞毒性であり、又はヒト卵巣癌細胞を阻持する哺乳類の生存時間を延ばし、もしくはそのような細胞を阻持する動物においてヒト卵巣癌細胞の増殖を妨げる、有効な抗-ヒト卵巣癌免疫毒素を生成することにおけるそれらの有用性である。本発明の免疫毒素として適切なモノクローナル抗体は、最初に、抗-乳癌モノクローナル抗体の群内のモノクローナル抗体として定義された。

特許請求された抗体を選択することにおいて、

び試験された5個の血液細胞型の数の総数によって割られた、16個の正常組織の冷凍断片における染色された副構造体の数及び結合した血液細胞型の数の総数として定義される。123個の副構造体及び5個の血液細胞型がこの試験において計数された。抗体は、それらが0.11か又はそれよりも低い選択性を有し、そしてヒト卵巣癌組織に結合される場合、卵巣癌免疫毒素の目的のための適切な候補体であると見なされた。

1つのハイブリドーマによって産生された抗体は、200 Kダルトンの抗原を認識することが見出された。2種のハイブリドーマからの抗体が、42 Kダルトンの抗原に結合した。4種のハイブリドーマからの抗体が1又は複数の高分子量ムチン(HMW)に結合し、そして2種のハイブリドーマからの抗体が95 Kダルトンの抗原の形でのトランスフェリン受容体に結合した。2種のハイブリドーマからの抗体が55 Kダルトンの抗原の同じエпитープに結合した。前記のすべての抗原の分子量は、当業界において知られている方法を用いて、

およそ22,000の増殖性ハイブリドーマ培養物が、最初に、免疫性乳癌腫膜又は細胞系、7種の正常な組織膜のパネル、繊維芽細胞系及び乳癌腫冷凍断片に対してスクリーンされた。腫瘍物質と反応するが、しかし正常な物質とは反応しないクローンを、この最初のスクリーンにおいて同定し、そしてイソタイプについて選択し、そして選択性及び種類についてさらにスクリーンした。この追加のスクリーニングは、16個の正常な組織断片、5個の血液細胞型、11個の非乳癌腫断片、21個の乳癌断片及び14個の乳癌細胞系を含んだ。この追加スクリーニングにおいては、多数のモノクローナル抗体が、卵巣癌の組織断片に結合するが、しかし正常な卵巣組織断片には結合しないように思われた。

この特許の目的のためには、適用、特異性及び選択性が、交換可能的に使用され、そしてすべての組織(ここで、モノクローナル抗体が試験された)において、いずれかのモノクローナル抗体によって結合された副構造体(substructure)の合計数及

還元状態下でドデシル硫酸ナトリウム(SDS)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって決定された。

これらの抗体のさらに詳しい特徴は、下の例に提供されている。

最も重要である本発明の免疫化学的誘導体は、モノクローナル抗体及び細胞毒性剤の接合体である。

手術後の新鮮なヒト乳癌組織及び種々の正常な組織を用いて、ホモジナイゼーション及び不連続スクロースグラジェント遠心分離によって膜抽出物を調製した。ヒト乳癌細胞系を、Breast Cancer Task Force, the American Type Culture Collection(ATCC)及びDr. Jorgen Fogh at Memorial Sloan Kettering から得た。その細胞を、Breast Cancer Task Force, the ATCC 及びDr. Fogh によって推奨されるようにして保存し、そして運んだ。免疫化のために、100 μ gのタンパク質を含む膜抽出物(Lowryアッセイ)又は1000万の生きている乳癌細胞のいずれかを、5週才のBalb/c マウス中の腹

膜内に接種した。そのマウスを、1カ月間隔で2度同じように追加免疫した。最後の追加免疫の後、3日後、細胞融合のために脾臓を除去した。

体細胞ハイブリッドを、ネズミ骨髓腫系Sp-2/0/Agl4を用いて、Buck, D.W., など、前記の方法によって調製した。すべてのハイブリドーマ細胞系を、限界希釈法によってクローン化した。マウスからの脾臓細胞を使用した融合体の半分を、乳癌膜抽出物により免疫化し、そしてマウスからの脾臓細胞を使用した半分を、生きている乳癌細胞系により免疫化した。83,424個のウェルを、これらの融合体から生成し、そしてこのうち22,459個がハイブリドーマの増殖を示した。

ハイブリドーマ上清液を、免疫性乳癌膜抽出物と共に固相酵素結合のイムノソルベントアッセイ(ELISA)又は免疫性乳癌細胞系と共に間接的な免疫蛍光アッセイのいずれかで反応性抗体について分析した。固相膜ELISAのためには、0.1mg/ml乳癌膜タンパク質40μlを、4℃で12時間、塩化ポリビニル(PVC)微量力価ウェル中

ウスモノクローナル抗体を含まない培地を用いてのバックグラウンドは、 0 ± 0.1 の光密度ユニット(O.D.)であった。0.7 O.D.よりも大きな乳癌膜抽出物に基づく反応を与えるウェルを、貯蔵した。

間接的免疫蛍光細胞系アッセイのためには、免疫性細胞系の100,000個の乳癌細胞を、8チャンバースライドのセットのそれぞれのチャンバー中に、適切な培地と共に1晩置いた。同様に、細胞系CC95からの100,000個の繊維芽細胞を、チャンバースライドウェル中に1晩、インキュベートした。その細胞を、1%BSAを含むPBSにより洗浄した。乳癌細胞及び繊維芽細胞の両者のウェルを、ハイブリドーマ上清液の1:10希釈溶液と共に4℃で30分間、インキュベートした。その細胞を、再び洗浄し、そしてフルオレセインイソチオシアネート(FITC)-接合のヤギF(ab')₂抗マウスIgの1:50希釈溶液と共に、4℃で30分間、インキュベートした。その細胞を、3度洗浄し、PBS中1.5%ホルムアルデヒド中で5分間、固定し、チャンバーを除去しそして

に置いた。抽出物を吸出し、そしてそのウェルを、1%ウシ血清アルブミン(BSA)を含むリン酸緩衝液(PBS)により洗浄した。次にそのウェルを、ハイブリドーマ上清液の1:10希釈溶液45μlと共にインキュベートした。希釈剤は、25mM緩衝液、10%ウシ血清及び0.1%アジ化ナトリウムを含む培地であった。室温で30分後、そのウェルを再び洗浄し、そして37℃で45分間、ペルオキシダーゼ接合のヤギ抗マウスIgGの1:200希釈溶液と共にインキュベートした。その希釈剤はPBSであった。次に、そのウェルを、PBSにより洗浄し、そして室温で30分間、pH4.2の0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液中1,2-アジノージ(3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸)200μlと共に反応せしめた。光学密度を、Micro Elisa Readerにより405nmで測定した。おのおの実験のために、陽性対照、すなわち5μg/mlでの抗β-2ミクログロブリンを、正常なヒト腎臓膜と共に反応せしめた。これは、 1.0 ± 0.1 (標準偏差)の光学密度を与えた。マ

PBS中でゆすいだ。次に、そのスライドを、ポリビニルアルコール、グリセロール、緩衝液及び保存剤を含む組成物中に固定し、そして蛍光顕微鏡により試験した。乳癌細胞に対して強い蛍光結合性を示すが、但し繊維芽細胞に対して蛍光結合性を示さないハイブリドーマウェルを、貯蔵した。5,156個のハイブリドーマウェルが、最初のスクリーンにおいて乳癌反応性を示した。

次に、5156個の陽性ウェルからの上清液を、7種の正常組織の膜抽出物(肝臓、肺、結腸、胃、腎臓、扁桃腺及び脾臓)と共に固相ELISAで試験した。0.3よりも大きなELISA O.D.を与えるすべての上清液を、捨てた。1101の上清液が、正常な組織抽出物と反応しないことが見出された。

その1101個のハイブリドーマ上清液を、ヒト乳癌組織の冷凍断片に対して試験した。6ミクロンの断片をスライドにはり付け、4℃で10分間、アセトン中で固定し、室温で10分間、乾燥せしめ、PBSにより洗浄し、ウマ血清によりブロックしそして100μlのウシハイブリドーマ上清液

と共に室温で20分間、インキュベートした。そのスライドを、PBSにより洗浄し、そして最後に、ペルオキシダーゼ接合のウサギ抗マウスIgの1:50希釈溶液と共に37℃で20分間、インキュベートし、再びPBSにより洗浄しそして最後に、0.01%過酸化水素を含む、pH7.2の0.05M Tris 緩衝液中0.5 mg/ml ジアミノベンジジンと共に37℃で7.5分間、インキュベートした。そのスライドを、ヘマトキシリンにより染色し、脱水しそして35.9%メチル/n-ブチルメタクリレートコポリマー、7.1%ブチルベンジルフタレート及び0.3%2,6-ジタートブチル-p-クレゾールを含む培地中に固定した。124のウェルが乳癌選択結合性を与え、そしてクローン化された。

モノクローナル乳癌選択抗体の免疫グロブリンクラス及びサブクラスを、McDougalなど、J. Immunol. Meth. 63: 281~290(1983)において記載されたものと実質的に同じイムノドットアッセイによって決定した。抗体をまた、0.2 µCiの

のIgG抗体を、アガロース、デキストリン及び/又はアクリルアミドを含むプロテインA-クロマトグラフィー樹脂上でpH段階グラジェント分離によるアフィニティクロマトグラフィーによって精製した。プロテインAを結合しなかったIgG抗体は、0℃で40%飽和状態への硫酸アンモニウム添加又はDEAE又はAffigel™ (Biorad, Richmond, California)に結合することによって沈殿された。他方、IgG抗体を、Sephacryl S-200カラム、次に記載したようなDEAEセルロースを用いてクロマトグラフィーによって精製した。その沈殿物を、PBS中に再溶解し、pH7.2の20mM Trisに透析しそして4℃で1 ml/分の流速で1.5 lの0~600mMのNaClグラジェントにより分離するジエチルアミノエチルセルロース(DEAE)の1.6×50 cmカラム上でクロマトグラフィー処理した。おのおの場合、カラム画分を、SDS-PAGEによって調節し、そして最も純粋な抗体画分を、ブールし、1~3 mg/mlに濃縮し、PBS/0.02% NaN₃に対して透析しそして4℃で貯蔵した。

³⁵S-メチオニンを含むメチオニン不含培地中で2~3×10⁶個のハイブリドーマ細胞を、4時間、増殖することによって内部的にラベルした。³⁵S-ラベルされた抗体を、固定されたブドウ球菌A細胞又はウサギ抗マウス免疫グロブリンにより事前に被覆された、固定されたブドウ球菌A細胞により免疫沈殿化し、そしてその免疫沈殿物を、SDS-PAGEによって分析し、抗体のL及びH鎖の移動度、余分な鎖の欠乏及びブドウ球菌のプロテインAを結合するおのおのの抗体の能力を決定した。

その抗体を、インビトロ中で拡張した。Balb/c又はF1 (C57B/6×Balb/c)マウスを、0.5 mlのプリスタンにより腹腔内(i.p.)で感染し、そして10~14日後、PBS中、百万の対数増殖基のハイブリドーマ細胞により接種した。腹水を-70℃で貯蔵し、そして解凍し、そして0.8ミクロンのフィルターユニットを通して濾過し、そしてさらに精製した。

ブドウ球菌のプロテインAを結合したいくつか

IgM抗体を、室温で1 ml/分の流速でPBS/0.01%アジ化ナトリウムにより溶解する、Sephacryl S-300の2.6×40 cmカラム又は他のゲル濾過もしくはアガロース、デキストリン及び/又はアクリルアミドを含む樹脂上でゲル濾過材によって精製した。

それらの選択性を評価するために、その精製された抗体を、16種の正常な組織の断片に対するイムノペルオキシダーゼ断片染色によって及び5種の血液細胞型に対する免疫蛍光細胞選択によって精製した。イムノペルオキシダーゼ染色を、上記のようにして実施した。但し、1~40 µg/mlの範囲で、PBS中精製された抗体の既知希釈溶液を、ハイブリドーマ上清液の代わりに使用した。その純粋な抗体を、まず滴定し、乳癌断片に対して強いイムノペルオキシダーゼ染色を与える最少濃度を見出し、そして次に正常な組織の試験のためにその濃度で使用した。正常な卵巣組織は、検出できる結合性を示さなかった。

末梢血液細胞(血小板、リンパ球、赤血球、顆

098(8)

培養地中で、4時間、
した。33S
ウ球菌A
ンにより
菌A細胞
と膜物を、
及びH鎖の
のプロテ
を決定し

Ba2 b/c
0.5 ml
とし、そ
増殖基の
水を-70
ミクロン
そしてさ

いくつか

でPBS/
、Sephacryl
ル濾過も
又はアク
によって精

の精製さ
に対する
て及び5
択によっ
色を、上
0 μg/
の既知希
りに使用
乳癌断片
色を与え
組織の試
卵巣組織

血球、顆

粒球及び単球)を、多形核白血球から単球を分離
する培地を用いて、遠心分離によって調製した。
その細胞を、4℃で30分間、上で決定された最
適濃度で抗体と反応せしめ、洗浄し、4℃で30
分間、フルオレセインイソチオシアネート接合の
ヤギ抗-マウスIgの1:50希釈溶液と反応せ
しめ、再び洗浄しそして細胞選別器により試験し
た。その洗浄緩衝液及び希釈剤は、1%ゼラチン
及び0.02%アジ化ナトリウムを含むPBSであっ
た。その細胞選別器は、76ミクロンのノズル及
び488nmで1Wのアルゴンイオンレーザーを備え
ている。80mmの共焦レンズを、焦点を合わせるた
めに光学レールアセンブリー上に使用した。使用
される他のフィルターは、515nmの干渉フィルタ
ー及び515nmの吸収フィルター(散乱されたレー
ザー光のための)並びに前方角度の光散乱
(forward angle light scatter)のためにニュト
ラルデンシティ1.5フィルターであった。前方
角度の光散乱に対する対数フルオレセイン発光の
輪郭プロットが、サンプル分析のために使用され

た。
本発明の免疫毒素において有用な抗体の、正常
な組織断片上での結合挙動が下の第1表に報告さ
れる。次の省略形が抗体によって結合される構造
体を示すために使用される:Ac, 腺房;G, 腺;
T, 小管;D, 管;L, 管腔;W, 汗腺;E, 上
皮;S, 皮脂状腺;Gr, 顆粒球;Mr, 巨核球;
M, マクロファージ;Ly, リンパ球;B, 基
底層;Fe, 病巣上皮;A, アベオラー(aveolar)
内層細胞;B, ボーマンズ カプセル;Mu, 筋
肉;I, 島;X, ガングリア/神経;V, 血管;
及びH, 毛包。選択性は、前に記載したようにし
て定量化された。末梢血液細胞に対する抗体の結
合挙動は、第2表に報告される。そのモノクロ
ナル抗体の選択性は、第3表に示される。
以下公白

第1表

卵巣MABの正常な組織結合

MAB	腺房	食道	肺	腎臓	結腸	胃	腸	扁桃腺	肝臓	心臓	卵巣	皮膚	骨髄	子宮	膀胱	正常な乳房
1 2G3	2Ac	2E	1A	2T	0	1L	0	1E	0	0	0	0	0	2L	2E	2E
2 9C6	0	2E	0	0	0	1L	0	1Ly, 2E	0	0	0	0	2Gr	0	0	2E
3 33P8	0	2E	0	1T	0	0	0	1Ly	0	0	0	1W	1Mk	1L	1E	0
4 44B2	0	1E	0	0	0	1G	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
5 44F4	1Ac	2E	0	1T, B	1L	2L	0	1E	0	0	0	1H	2Gr	2L	0	2E
6 120H7	0	1E	0	1T	0	1L	0	0	0	0	0	2S	0	2L	0	0
7 200F9	1Ac	0	0	2L	0	0	0	0	0	0	0	2S	0	0	0	0
8 204F4	0	2E	0	2T	2X	2X	0	2Ly, E	0	0	0	2S, W	0	2L	0	1E
9 219F3	1Ac	2E	0	1T	0	0	0	1Ly, E	0	0	0	2H, W	1-2Gr	1G	0	2E
10 245E7	1L	0	1A, M	0	0	2L	0	1E	0	0	0	2S	0	2L	1E	2L
11 260F9	1Ac	2E	0	1T	0	1G	0	2E	2D	0	0	2E, 2H	0	1L	2E	2E
12 266B2	1Ac, 1D	2E	0	1T	0	0	0	2E	0	0	0	2E, 2W	0	0	1E	1E
13 280D11	0	1E	0	2T, B	1L	2L	0	0	2D	0	0	1E, 1H	2Gr	2G	0	2L
14 317G5	1Ac, 1	0	0	2T	1G	0	0	0	2D	0	0	0	0	1G	0	0
15 369F10	0	0	0	0	0	1G	0	0	0	0	0	1S	0	0	0	0
16 388D4	2Ac, 11	2E	0	1-2T	1-2G	1L	0	1E	0	0	0	2E, S, W	0	1G	2E	1
17 421E8	1Ac	1E	0	1T	0	1G	0	0	1	0	0	0	0	1G	0	0
18 451C3	0	0	2H	0	0	0	1V	2Ly, 1BL	0	0	0	0	2	1G	0	0
19 454A12	0	0	1H	0	1G	0	0	0	0	0	0	0	1	1E	0	0
20 454C11	1D	1-2E	0	1T	0	0	0	1E	1D	0	0	1E, H	0	1G	1E	1E
21 650E2	1Ac, 1	0	1-2A	2T	2G	0	0	0	2D	0	0	0	0	2G	0	1
22 788G6	0	0	0	2T	0	0	0	1FE	0	0	0	0	0	0	0	0
23 871B3	21, Ac, D	1FE	0	0	1G	1G, 2Gr	0	1E, Ly	0	0	2Gr	1S	0	0	0	0

13	280D11	390000	8.8×10^4	MCF7
14	317G5	3200000	1.6×10^4	CAMA1
15	369F10			
16	388D4			
17	421E8			
18	451C3	400000	4×10^4	MCF7
19	454A12	470000	1.2×10^4	MCF7
20	454C11	390000	4.8×10^7	ZR7530
21	650E2			
22	788G6			
23	871E3			

モノクローナル抗体によって認識された抗原を同定するために、抗原の免疫沈殿法を、次の方法に従って行なった。8mmの直径のポリスチレンボール(Precision Plastic Ball Co.)を、氷酢酸中、10%発煙硝酸により被覆し、そして50℃の水浴中で3時間、インキュベートした。酸処理した後、そのボールを、蒸留水により3度すすぎ、0.1M NaOH中、1%亜ジチオン酸ナトリウムに

より被覆し、そして50℃の水浴中で3時間、インキュベートした。そのボールを、再び蒸留水により3度すすぎ、0.1%1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(EDAC)、0.2%スベリン酸(ジメチルホルムアミド中に溶解されたスベリン酸)により被覆し、そして室温で1晩インキュベートした。そのボールを、蒸留水により3度すすぎ、そして識別のために印を付けた。

精製されたモノクローナル抗体を、2-(N-モルホリン)エタンスルホン酸緩衝液中において0.2mg/mlに希釈し、そして前もって処理され、そして印を付けられたポリスチレンボールを、個々のチューブ内に置き、そして450μlの希釈された抗体及び50μlの新鮮な1%EDACにより被覆した。チューブに蓋をし、そして25℃で24時間、インキュベートした。このインキュベーションの後、そのボールを、PBSにより2度すすぎ、そして新鮮で使用するか又は使用する前、4℃で数日間、保存した。

新たにラベルされたターゲット細胞抽出物を、Marchalonis, J., "An Enzymic Method for the Trace Iodination of Immunoglobulins and other Proteins", *Biochem. J.* 113: 299~305(1969)のラクトペルオキシダーゼ法によって125-Iにより又は35-Sメチオニン中での増殖によって35-Sによりラベルされたヒト乳癌細胞系から調製した。そのラベルされ細胞を、可溶化緩衝液(1%(v/v) Triton X-100, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 25mM Tris-HCl, pH=7.5)中に溶解した。4部のラベルされた抽出物を、50mg/ml ウム血清アルブミンを含む1部の可溶化緩衝液と共に容器中で混合し、最終濃度10mg/mlのBSAを得た。モノクローナル抗体により被覆されたボールを、その容器に添加し、そして振盪しながら氷上で4時間、インキュベートした。ラベルされた抗原を、その容器からピペットで取り、そしてそのボールを、可溶化緩衝液により4度すすいだ。次に、そのボールを取り出し、100μlのLaemmli SDS ゲルサンプル緩衝液を含む個々のチューブ内

に置き、そして熱湯中で3分間、インキュベートした。そのボールを取り出し、そしてそのサンプルを、適切な標準液と共にSDSゲル上に注いだ。

その抗体に対する免疫沈殿試験は、それらのうち8種(2G3, 120H7, 200F9, 204F4, 245E7, 369F10, 788G6 及び871E3)すべてが高分子量ムチン(HMW)に結合することを指摘する。2種は(260F9 及び266B2)、55Kdの糖タンパク質抗原の同じエпитープに結合する。2種は(317G5 及び650E2)、42Kdの抗原に結合する。2つの抗体(451C3 及び454A12)は、95Kdの抗原の形でのトランスフェリン受容体に結合した。451C3 及び454A12のいづれも、受容体へのトランスフェリンの結合を妨げなかった。試験されたモノクローナル抗体の抗原結合特徴は、第6表に要約される。

以下余白

間、イ
留水に
(3-
ド
ムアミ
し、そ
ボール
のため

(N-
おいて
理され、
を、個
希釈さ
より被
で24
-ペー
2度す
る前、

ベート
サンブ
注いだ。
らのう
9P10、
(HM
260P9
同じエ
0E2)、
1C3 及
ンスフ
12のい
合を妨
体の抗

第 6 表

卵巣モノクローナル抗体によって認識される抗原

M A B	抗原
1 2G3	H M W
2 9C6	7 5 Kd
3 33F8	6 6 Kd
4 44B2	
5 44F4	18 . 39 . 72 . 81 . 175Kd(すべてはバンドを拡散する)
6 120H7	H M W
7 200P9	H M W
8 204F4	H M W
9 219F3	
10 245E7	H M W
11 260P9	5 5 Kd
12 266B2	5 5 Kd
13 280D11	
14 317G5	4 2 Kd
15 369F10	H M W
16 388D4	

り、そして0.02%アジ化ナトリウムを含む PBS-BSA 中に4℃で保存することができる。他方、ストリップを、空気乾燥し、そして4℃で乾燥保存することができる。3 ml のハイブリドーマ培養上清液又は PBS-BSA により希釈された上清液を含む一連の小さな管を用意する。1:10の希釈溶液が一般的に好結果をもたらす；そしていくつかの上清液を、1:200 ほどに希釈することができる。ニトロセルロースのストリップを、室温で1時間、おのこの管内でインキュベートする。そのストリップを、PBS-BSA により3度すすぎ、そして室温で1時間、希釈されたウサギ抗マウスーホースラティッシュペルオキシダーゼ中でインキュベートする。そのストリップを、PBS-BSA により2度及びTris緩衝液により2度すすぎ。そのストリップを、十分な色が抗-イソタイプスポット上に進展するまで(普通3~4分)、ジアミノベンジジン及び過酸化水素を含むTris緩衝液中に置く。
その抗体イソタイプが第7表に示される。

17 421E8	
18 451C3	9 5 Kd (トランスフェリン受容体)
19 454A12	9 5 Kd (トランスフェリン受容体)
20 454C11	2 0 0 Kd
21 650E2	4 2 Kd
22 788G6	H M W
23 871E3	H M W

抗体のイソタイプを、次のようにして決定した:
5 mm 平方のグリッドを、ニトロセルロースシート上に鉛筆で薄く描き、そして抗イソタイプ血清 (Litton Bionetics, Kensington, Maryland, マウス κ , λ , α , $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$, $\gamma 3$ 及び μ 鎖に対するウサギ抗血清) の 1 ml 小滴を適用し、その結果、おのこの列の正方形は、おのこの H 及び L 鎖試薬の1つのスポットを受ける。そのシートを、湿った室内で1時間室温でインキュベートし、すぐに1% (w/v) を含む PBS-BSA によりすすぎ、そして4℃で PBS-BSA 中に1晩放置する。ストリップを、ハサミでばらばらに切

第 7 表

卵巣モノクローナル抗体のイソタイプ

M A B	イソタイプ
1 2G3	G 1
2 9C6	M
3 33F8	G 1
4 44B2	G 1
5 44F4	G 3
6 120H7	M
7 200P9	G 1
8 204F4	M
9 219F3	G 1
10 245E7	G 1
11 260P9	G 1
12 266B2	G 1
13 280D11	G 1
14 317G5	G 1
15 369F10	M
16 388D4	G 1
17 421E8	G 1

18 451C3	G 1
19 454A12	G 1
20 454C11	G 2 A
21 650E2	G 1
22 788C6	G 1
23 871E3	M

抗体を、Bjorn など、"Evaluation of Monoclonal Antibodies for the Development of Breast Cancer Immunotoxins," *Cancer Res.* 45: 1214~1221(1985) 及び Carlsson, J. など、*Biochem. J.* (1978) 173: 723~737 によって記載されているようにSPDPにより又はイミノチオレーン (IT) により処理し、そしてリシン毒素A鎖 (RTA) に接合し、本発明の免疫毒素を製造した。

20倍のモル過剰量のSPDP (エタノール中において20mM) を抗体に添加し、そして室温で30分間インキュベートした後、反応しなかったSPDPを、PBSに対する透析によって除去した。誘導体化の程度は、ジチオトレイトール (DTT) に

よる還元の後、343nmでビリジン-2-チオンの放出を測定することによって決定された。抗体に依存して、3~8個のリシンアミノ酸基 (抗体分子当り) が、ビリジル-ジスルフィド誘導体に転換された。

SPDP処理された抗体を、RTAに接合した。接合のすぐ前で、RTAを50mMのDTTにより還元し、次にアガロース、デキストラン及び/又はアクリルアミドを含むクロマトグラフィー樹脂のカラム上で脱塩し、タンパク質からDTTを除去する。還元されたRTAは、ビリジル-ジスルフィドよりも3~5倍のモル過剰量で抗体に添加された。典型的な反応混合物 (1mL) は、1μM抗体及び30μMのRTAから成った。その反応を、4℃で一晩、進行せしめた。抗体へのRTAの接合の程度を、ビリジン-2-チオンの放出を測定することによって分光測光的に決定した。平均して、接合体は、抗体分子当り2~3個のRTA分子を含んだ。これは、非還元性 SDS-PAGEゲル (7.5%) によって確認され、そしてそれはま

た、典型的な接合体調製物が10%~30%の遊離抗体を含んだことを示した。

接合体混合物を、HPLCサイズ排除カラム上でクロマトグラフィー処理し、残存する反応しなかったRTAから接合体を分離した。そのカラムを、0.1Mの硫酸ナトリウム/0.02Mのリン酸ナトリウム (pH=6.8) により平衡化した。接合体混合物 (0.7mL) を、注入し、次に1mL/分の流速でクロマトグラフィー処理した (室温)。0.5mLの画分を集め、そしてピークの接合体画分をブールし、そしてフィルターを細胞毒性試験の前に消毒した。

0.10Mのリン酸ナトリウム、0.001MのNa EDTA, pH=8.0 (この後、P-EDTA緩衝液として言及する) 中におけるおよそ30mg/mLの抗体を、室温で約15分間、1mMの5,5'-ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸) (DTNB) と反応せしめ、そして次に氷浴中で0℃に冷却する。十分なITを、この溶液に添加し、抗体分子当り平均2.5のIT分子を得、そしてこの得られた溶液を、0~5℃

で、300倍過剰体積のP-EDTA緩衝液に対して透析する。

1mMのDTTを含むP-EDTA中に通常保存されているRTAを、10~15mg/mLの濃度に限外濾過し、そして0~5℃で、300倍過剰体積のP-EDTAに対して透析する。十分なRTAを、誘導体化された抗体に添加し、誘導体化された抗体上の阻止されたチオール当り平均1.0~1.2のRTA上の遊離チオールを得る。この混合物を、室温で2時間、インキュベートする。

その結合反応混合物を、固体支持体に共有結合されたブルー色素 (トリサクリルブルー) に基づくクロマトグラフィー樹脂のカラムに適用し、そして次にその混合物を、室温でP-EDTAにより溶離する。そのカラムは、出発抗体のmg当りおよそ2mLのベッド体積を含むような割合で作られる。接合しなかった抗体の初期ピークがカラムから溶離された後、溶離剤が1MのNaClを含むP-EDTAに変換される。免疫接合体及び反応しなかったRTAを、ひじょうに鋭いピークとしてこの緩

9098 (14)

ーチオンの
た。抗体に
基（抗体分
誘導体に転

合した。接
Tにより選
及び／又は
ー樹脂の
TTを除去
ージスルフ
本に添加さ
よ、1μM
その反応
のRTA
の放出を
した。平
個のRT
PAGEゲ
それはま

対して透

保存され
に限外濾
積のPー
、誘導体
抗体上の
のRTA
、室温で

共有結合
）に基づ
用し、そ
こより溶
りおよそ
作られる。
から溶
、Pー
なかつ
この緩

術液中に溶解し、そしてこれをブールしそして0
～5℃で10倍過剰体積の0.15Mのリン酸ナトリ
ウム、(pH=7.1)(この後、PI緩衝液として言
及する)に対して透析する。その透析されたタン
パク質を、0～5℃でサイズ排除ゲルのカラムに
適用し、そして6cm/時の流速で緩衝液により溶
離する。そのカラムは、適用されたタンパク質の
ml 当り少なくとも25mlのベッド体積を含む
ような割合で作られる。免疫接合体が、排除体積
のすぐ後に、単一のピークとして溶離され、その
後、ベースラインまで落ち、次に二量体及び単量
体のRTAのピークが続く。そのブールされた免
疫接合体ピークを、35psiで限外濾過し、5.0
cm/mlの最終濃度にし、そしてフィルターを消
毒する。

本発明は、次の例によってより一層理解され、
そしてその例は例示的であり、限定するものでは
ない。

例 1

16～22gの重さの雌性無胸腺ヌードマウス

その結果は第8表に報告する。第8表及び次の
表において、“はれ指数(Swelling Index)”とは、
次のように定義される：0＝腹部のはれがない；
1＝わずかに目に見える腹部のはれ；2＝中ぐら
いの腹部のはれ；及び3＝ひどい腹部のはれ。

第 1 表

実験 A

試験物質	投与量	生存数 (85日)	はれ 指数	平均生存日
317G5-IT-RTA	50 μg	0	—	49.8+/-10
	100 μg	2	3	60.2+/-5.2
260F9-IT-RTA	50 μg	0	—	26+/-1.4
	100 μg	0	—	24.6+/-3.3
113P1-IT-RTA	25 μg	0	3	32.2+/-13.9
	50 μg	0	—	29+/-3.0
PBS対照	0.1 ml	0	—	29

(Nu/Nu、Balb/c系)を用いた。NID:
OVCAR-3 腹水細胞を、キャリアーマウスから得た。
その細胞を、リン酸緩衝液(PBS)により2
度洗浄し、そして2体積のPBSに対しておよそ
1体積の細胞でPBS中に再懸濁した。細胞の計
数を、血球計数器により計数することによって決
定した。細胞生存度を、トリパンブルー色素排除
試験によって決定した。おのおのの動物を、日ゼ
ロで、5×10⁷個の生存細胞により腹腔内に注射
した。4、7及び10日目に免疫毒素を注射した。
この免疫毒素は普通、0.1mlのPBSで投与さ
れた。対照動物を、同じスケジュールに基づいて
0.1mlのPBSにより注射した。5匹の動物を、
試験されるおのおのの免疫毒素の個々の投与及び
対照のために使用した。動物を毎日、観察した。
おのおの実験において、対照と比較して生存時
間の増大により又は同じ生存時間を有する対照と
比較して処理された動物の腫瘍拡大の阻止による
ほとんど少ない腹部のはれによって、効果が決定
された。

実験 B

試験物質	投与量	生存数 (85日)	はれ 指数	平均生存日
PBS	—	0	3	48
454A12-IT-rTA	25 μg	1	2	>74
280D11-IT-RTA	50 μg	1	2	>66
	100 μg	2	2	>71
2G3-IT-RTA	50 μg	0	3	30
	100 μg	0	3	35

例 2

次の例において、実験は前の例に記載されてい
るようにして本質的に行なった。但し、動物は4、
6及び8日目に注射された。この例は、免疫毒素
454A12-IT-rTAの抗-腫瘍効果が、腫瘍を担持す
る動物を、免疫毒素が誘導される、過剰のモノク
ローナル抗体454A12により処理する場合、阻止さ
れることを示す。MOPC21、すなわちヒト卵巣腫瘍
特異性でない抗体は、過剰量で投与される場合、
対応する阻止効果を持たない。

第 9 表

試験物質	投与量 (μ g)	生存数 (69日)	はれ 指数	生存日 (平均日)
P B S	-	0	3	4 1
454A12-IT-RTA	25	4	0	> 6 9
454A12-IT-RTA + 454A12 (500 μ g)	25	0	3	2 6
454A12-IT-RTA + MOPC21 (500 μ g)	25	3	1	> 6 5
317G5-IT-RTA	50 100	2 4	0 0	> 6 0 > 6 5

例 3

この実験に使用される方法は、本質的に例1と同じある。この実験は、RTAに接合される、Fab' 2フラグメントの454A12から成る免疫毒素が454A12-IT-RTAに匹敵する抗腫瘍活性を有することを示す。

第 10 表

試験物質	投与量 (μ g)	生存数 (34日)	はれ 指数	生存日 (平均日)
P B S	-	3	3	> 3 4
454A12-IT-RTA	10	2	0	> 3 4
454A12-IT-RTA	25	3	0	> 3 9
454A12-IT-RTA	50	4	0	> 3 9
454A12-RTA (Fab' 2)	10	3	0	> 3 9
	25	4	0	> 3 9
	50	3	0	> 3 4

例 4

次の例は、いくつかの卵巣癌細胞系に対する免疫接合体のインビトロでの細胞毒性を示す。

NID: OVCAR-2, -3, -4 及び-5を、卵巣癌を有する患者の悪性腹水から単離する。これらの細胞系は、次の引用中で前に記載されており、そしてこの開示を引用によりこの明細書中に組み入れる。Hamiltonなど., "アンドロゲン及びエストロゲン受容体を有するヒト卵巣癌細胞系(NID: OVCAR-3)の特徴化(Characterization of Human Ovarian Carcinoma Cell Lines with Androgen and Estrogen

Receptors" *Cancer Res.* 43: 5379~5389(1983). Hamiltonなど., "卵巣癌の実験的モデルシステム: 新処理アプローチの計画及び評価への適用 (Experimental Model Systems of Ovarian Cancer: Applications to the Design and Evaluation of New Treatment Approaches" *Seminars in Oncology* 11: 285~298 (1985). 卵巣癌細胞系A1847を、S. Aaronson (National Cancer Institute, Bethesda, Maryland) から得た。その卵巣細胞を、RPMI培地1640、10%ウシ胎児血清、10 μ g/mlのインシュリン及びベニシリノーストレプトマイシン中で増殖した。KB細胞を、ダルベッコの変性イーグル培地(DMEM)、10%ウシ血清、グルタミン及びベニシリノーストレプトマイシン中で増殖した。組織培養培地(血清、グルタミン及び抗生物質)を、Grand Island Biological Co., Grand Island NY から購入し、そしてインシュリンを、Elanco Products Company, Indianapolis, IN から得た。タンパク質合成阻害アッセイのために、細胞を、使用する1日前、 2×10^5 個の細胞/

35 mm皿でプレートした。免疫毒素を添加する前、細胞を、ウシ血清アルブミン(2 mg/ml)を含むDMEM (DMEM-BSA)により2度洗浄した。挙げられた免疫毒素は、イミノチオレーン誘導体化及び上記のようにしてRTAへの接合によって製造された。

タンパク質合成の阻害法を用いて、免疫毒素の活性を測定した。細胞を、37℃で24時間、種々の濃度の免疫毒素を含むDMEM-BSAと共にインキュベートし、そして次にPirkerなど., "ブソイドモナスの外毒素に結合された抗-トランスフェリン受容体抗体: ヒト卵巣癌細胞系における典型的な免疫毒素(Anti-Transferrin Receptor Antibody Linked to *Pseudomonas* Exotoxin: A Model Immunotoxin in Human Ovarian Carcinoma Cell Lines)" *Cancer* 45: 751~757 (1985)に記載されたようにTCA-不溶性物質への(3 H)ロイシン(New England Nuclear, Boston, MA: 比活性 = 140.8 Ci/mmol)の組込みについて分析した。重複体の平均値は、免疫毒素を受けなかった

生存日
(平均日)

> 3 4
> 3 4
> 3 9
> 3 9
> 3 9
> 3 9
> 3 4

する免
・
を有す
細胞系
してこ
れる。
コゲン
AR-3)
ian
Estrogen

る前、
を含
げら
及び
造さ
素の
、種
イン
ソイ
フェ
典型
ntibody

1
all
され
イシ
生
斤し
った

同じ細胞系の対照の百分率として表わされた。

10 nM又はそれよりも低い処理されなかった対照 (ID₅₀) と比較して、タンパク質合成の50% 阻害を与える免疫接合体が有効であると思われた。試験された免疫接合体のID₅₀は、下の第11表に挙げられる。

第 11 表

インビトロ細胞毒性 (ID₅₀ (nM))

RTA接合体	OV-2	OV-3	OV-4	OV-5	A1847	KB
454A12	0.04	0.05	0.05	0.03	---	0.01
317G5	0.1	0.2	0.1	0.3	---	0.1-2
260F9	0.2	0.5	0.2	0.2	> 5	140
113F1	---	2	---	---	---	---
280D11	> 30	4	13	> 20	> 30	120
2G3	---	8	---	---	---	---
369F10	---	10	---	---	---	---
454C11	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5
520C9	> 5	---	---	---	---	---
245E7	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30

リクロロ酢酸により2度洗浄した。細胞を乾燥せしめ、シンチレーション液を添加し、そして放射能を、Packazol CL/D 液体シンチレーションカウンターにより測定した。

タンパク質合成の阻害を、おのこのバイアルについてのTCA沈殿可能な³⁵Sの組込みとして計算した。平均値は、免疫毒素を受けなかった同じ細胞系の対照の百分率として示された。ID₅₀は、例4におけるようにして決定された。その結果を、次の第12表に報告する。

第 12 表

インビトロ細胞毒性対OVCA-3

接合体	ID ₅₀ (nM)
454A12-RTA	0.05
454A12-RTA	0.2
454A12-(Fab') ₂ -RTA	0.4
317G5-RTA	0.2
113F1-RTA	2
2G3-RTA	3
260F9-RTA	4
280D11-RTA	30
454C11-RTA	50
369F10-RTA	> 56

例 5

例4において記載された免疫毒素を、NIB: OVCA-3 細胞に対して試験した。細胞を、RPMI 1640、10%ウシ胎児血清、10 μg/ml のインシュリン及びペニシリン-ストربتマイシン中に保持した。細胞を、トリプシンによる軽い消化又はバーセン(Versene)の添加によって、培養フラスコから取り出した。その細胞濃度を、調整した。4 × 10⁵ 個のNIB: OVCA-3 細胞を、培養1 ml 中に懸濁し、そして8 ml のガラスバイアル (ICN) に添加し、次に接合体希釈溶液 (100 μg/ml のウシ血清アルブミンを含むPBS 中における) を添加した。37℃で22時間インキュベートした後、その培地を吸い出し、その単層をPBSにより洗浄しそして0.5 μCiの³⁵S) メチオニン(Amersham: 1400 Ci/mモル) により補足された、0.5 ml のメチオニン不含培地を添加した。37℃で2時間インキュベートした後、その培地を吸い出し、そして細胞の単層を、メチオニン (1 μg/ml) を含む10%ト

245E7-RTA	> 56
520C9-RTA	> 112
HOPC21-RTA	> 112
HOPC21-RTA	> 80

例 6

この例は、上記のモノクローナル抗体及びブソイドモナスの外毒素を含む免疫接合体の細胞毒性を示す。

ブソイドモナス外毒素 (PE) は、Dr. S. Leppla (Ft. Detrick, Frederick, MD) のギフトであった。PEをまた、Swiss Serum and Vaccine Institute, Berne, Switzerland から商業的に入手することができる。PE接合体を構成し、そして前に引用 (Pirkなど、(1985)) によって本明細書に組込まれた方法の変法によって精製した。PE (30 nモル) を、5000 nモルの2-イミノチオレーン-HCl (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) 1 mMのEGTAを含む0.1 Mリン酸緩衝液 (pH = 8.0) 1 ml 中 500 nモルのNAD⁺ と37℃で1時間、反応せしめた。次に、その誘導体化されたPEを、

その反応体からHPLCを用いて分離し、そして5, 5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)の添加によって活性化し、最終濃度を1mMにした。抗体(40~50nモル)を、37℃で1時間、1mMのEGTAを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH=8.0)0.75mL中100~200nモルの2-イミノチオレーン-HClと共にインキュベートした。その抗体と、活性化されたPEとを反応せしめ、そしてその接合体を、記載されたようにしてHPLCを用いて精製した。Pirkerなど、(1985)。PEと抗体との一対一の接合体を含むピークを回収し、そして下に記載したすべての研究のために使用した。

タンパク質合成の阻害及びID₅₀を、上の例4に記載したようにして決定した。但し、その細胞を、12時間、免疫毒素と共にインキュベートした。代表的なタンパク質阻害アッセイからの結果を示し、そしてすべての実験の平均ID₅₀値を、第13表に提供する。ID₅₀は、その表においてng/mL及び(nM)として示される。

以下余白

第 13 表

タンパク質合成の阻害についてのID₅₀値^a(ng/mL)(nM)

細胞	454C11-PE	260F9-PE	280D11-PE
OVCAR-2	1.6(0.01)	3.4(0.02)	835(4)
OVCAR-3	3.6(0.02)	41.5(0.2)	805(4)
OVCAR-4	0.7(0.005)	4.7(0.02)	54(0.3)
OVCAR-5	10(0.05)	23(0.1)	3450(>15)
A1847	2.5(0.015)	385 ^c (2)	2200(>10)
KB	15 ^b (0.08)	>600(>3)	>250(>1)

a: 特にことわらない限り、この値は、少なくとも2つの実験の平均値である。

b: 1つの実験からの結果。

c: 非特異的な毒性。

本発明の免疫毒素を誘導するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのサンプルを、次の寄託番号下でAmerican Type Culture Collection又はCollections of In Vitro Internationalに寄託した。

以下余白

ATCC

ハイブリドーマ	寄託番号
2G3	HB 8491
280D11	HB 8487
266B2	HB 8486
245E7	HB 8489
31765	HB 8485
369F10	HB 8682
454C11	HB 8484
788G6	HB 8692
33F8	
260F9	HB 8488

204F4	
219F3	IVI 10072
388D4	
421E8	IVI 10064
871E3	
451C3	IVI 10081
650E2	IVI 10083
454A12	IVI 10075

これらの寄託は、ブダペスト条約に基づいて行なわれ、そしてその規定に従って保持され、そして入手可能である。

以下余白

In Vitro International Collection

ハイブリドーマ	寄託番号
9C6	IVI 10056
44B2	
44F4	
120H7	IVI 10061
200F9	IVI 10062

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☒ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.